



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 :

C12N 15/85, 15/86, A61K 48/00, C12N  
15/12 // 15/17, 15/23, 15/24

A2

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/01324

(43) Date de publication internationale: 18 janvier 1996 (18.01.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00894

(22) Date de dépôt international: 5 juillet 1995 (05.07.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/08300

5 juillet 1994 (05.07.94)

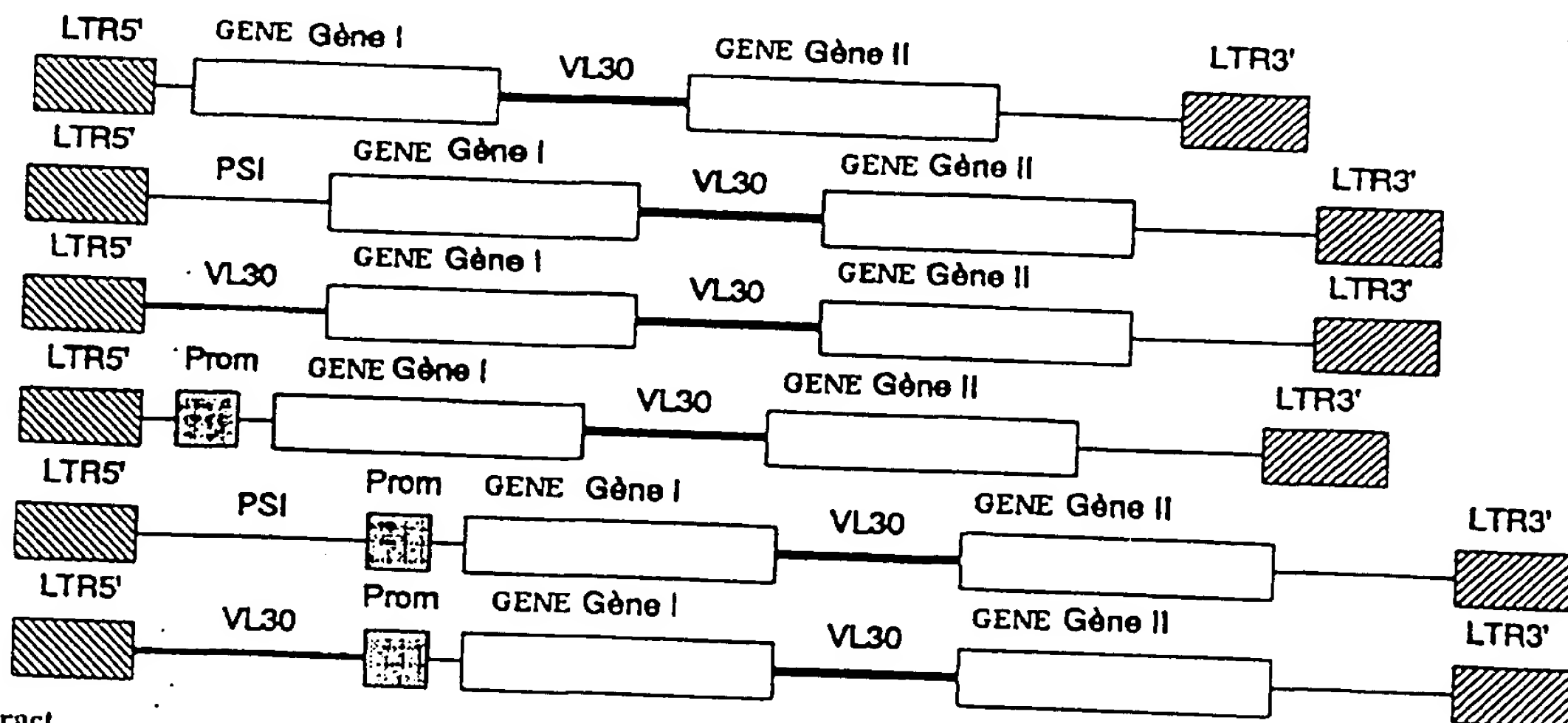
FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT  
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-  
75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BERLIOZ, Clarisse  
[FR/FR]; 13, rue Villebois-Mareuil, F-69003 Lyon  
(FR). JACQUEMOUD, Sandrine [FR/FR]; 212, avenue  
Félix-Faure, F-69003 Lyon (FR). TORRENT, Christophe  
[FR/FR]; 13, rue Villebois-Mareuil, F-69003 Lyon (FR).  
DARLIX, Jean-Luc [FR/FR]; Les Genêts II, F-69630  
Chaponost (FR).(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, av-  
enue Kléber, F-75116 Paris (FR).(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE,  
CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

Publiée

Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès  
réception de ce rapport.(54) Title: NOVEL INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE, VECTOR CONTAINING SAME AND THERAPEUTICAL USE THEREOF  
(54) Titre: NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTREE DES RIBOSOMES, VECTEUR LE CONTENANT ET UTILISATION THERA-  
PEUTIQUE

(57) Abstract

A novel internal ribosome entry site and a novel region for the encapsidation of a retrotransposon, and murine VL30s in particular, are disclosed. A vector and a eukaryotic cell containing said site and region, and their therapeutical or prophylactic use, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet un nouveau site interne d'entrée des ribosomes et une nouvelle région d'encapsidation d'un rétrotransposon et notamment des VL30 murins. Elle concerne également un vecteur et une cellule eucaryote les contenant ainsi que leur usage thérapeutique ou prophylactique.

# *UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Caméroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5

10

Nouveau site interne d'entrée des ribosomes, vecteur le contenant et utilisation thérapeutique

15 La présente invention concerne un fragment d'ADN isolé d'un rétrotransposon et comprenant un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Plus particulièrement, elle concerne des vecteurs d'expression comportant ce fragment d'ADN et notamment des vecteurs polycistroniques permettant l'expression efficace et stable de plusieurs gènes d'intérêt sous la dépendance d'un même promoteur. La présente  
20 invention trouve une application intéressante dans le domaine des vecteurs de thérapie génique.

La faisabilité de la thérapie génique appliquée à l'homme n'est plus à démontrer et ceci concerne de nombreuses applications thérapeutiques comme les maladies  
25 génétiques, les maladies infectieuses et les cancers. De nombreux documents de l'art antérieur décrivent les moyens de mettre en oeuvre une thérapie génique, notamment par l'intermédiaire de vecteurs viraux. D'une manière générale, les vecteurs sont obtenus par délétion d'au moins une partie des gènes viraux qui sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. De tels vecteurs peuvent être  
30 propagés dans une lignée de complémentation qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées pour générer une particule de vecteur viral déficiente pour la réplication mais capable d'infecter une cellule hôte. A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés mais on peut citer également des vecteurs issus des adénovirus, virus associés aux adénovirus, poxvirus et virus de l'herpès.  
35 Ce type de vecteur, leur organisation et leur mode d'infection sont largement

- 2 -

décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

Il peut être avantageux de disposer de vecteurs de thérapie génique plus performants et capables notamment de produire efficacement plusieurs protéines d'intérêt. Cependant, la présence de plusieurs promoteurs au sein du même vecteur se traduit très souvent par une réduction voire même une perte de l'expression au cours du temps. Ceci est dû à un phénomène bien connu d'interférence entre les séquences promotrices. Dans ce contexte, la publication de la demande internationale WO93/03143 propose une solution à ce problème qui consiste à mettre en oeuvre un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Elle décrit un vecteur rétroviral dicistronique pour l'expression de deux gènes d'intérêt placés sous le contrôle du même promoteur. La présence d'un site IRES de picornavirus entre ceux-ci permet la production du produit d'expression issu du second gène d'intérêt par initiation interne de la traduction de l'ARNm dicistronique.

Normalement, l'entrée des ribosomes au niveau de l'ARN messager se fait par la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ensemble des ARNm eucaryotes. Cependant cette règle universelle connaît des exceptions. L'absence de coiffe chez certains ARNm viraux laissait supposer l'existence de structures alternatives permettant l'entrée des ribosomes à un site interne de ces ARN. A ce jour, un certain nombre de ces structures, nommées IRES du fait de leur fonction, ont été identifiées dans la région 5' non codante des ARNm viraux non coiffés comme celle notamment des picornavirus tel que le virus de la poliomyélite (Pelletier et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103-1112) et l'EMCV (Encephalomyocarditis virus (Jang et al., J. Virol., 1988, 62, 2636-2643).

On a maintenant trouvé un nouveau site interne d'entrée des ribosomes dans les rétrotransposons murins de type VL30 et montré que ce site améliore la traduction des séquences codantes placées à sa suite.

Le génome des cellules eucaryotes comprend un certain nombre d'éléments génétiques cellulaires mobiles, appelés transposons, qui ont la capacité de se déplacer d'un site du génome à un autre choisi au hasard. A l'heure actuelle, on ignore leurs fonction et signification biologique. Certains d'entre eux, les rétrotransposons, apparaissent apparentés aux provirus rétroviraux par leur

- 3 -

organisation et leur mode de transposition (par un intermédiaire ARN, transcription inverse et intégration dans le génome cellulaire). Parmi les différents rétrotransposons murins identifiés à ce jour, figurent les éléments VL30. Le génome murin en comprend de 150 à 200 copies. Ils ont une longueur d'environ  
5 6 kb et possèdent à leurs extrémités des répétitions directes qui rappellent les LTRs rétroviraux. Ils sont défectifs pour la réplication et ne contiennent pas de séquences codantes (codons d'arrêt de la traduction dans les différentes phases de lecture). Ces éléments en tant que tels sont décrits dans la littérature et leur séquence nucléotidique connue (Adams et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 2989-2998 ; Van  
10 Beveren, Coffin et Hughes 1984. Restriction analysis of two genomes and restriction maps of representative retroviral proviruses and cellular oncogenes p.559-1209, ed : Weiss, Teich, Varmus et Coffin ; RNA tumor viruses, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory). Par ailleurs, ils peuvent être transmis d'une cellule à l'autre par encapsidation en présence d'un virus auxiliaire (helper).

15

Il n'était pas évident d'identifier une séquence IRES dans les éléments VL30 murins puisque ceux-ci sont dépourvus de séquences codant pour des protéines et ne présentent pas d'homologie frappante de séquence avec les sites déjà décrits dans la littérature. De plus, par rapport à ces derniers, le site IRES d'un VL30  
20 murin est particulièrement avantageux. En premier lieu, il permet un taux de réinitiation de la traduction efficace et stable à long terme et, d'autre part et de manière inattendue, il peut également, dans le cadre d'un vecteur rétroviral, remplir les fonctions de dimérisation et d'encapsidation et ceci indépendamment de sa position dans le vecteur. Et enfin, du fait de sa faible homologie avec les  
25 séquences rétrovirales, son emploi réduit considérablement le risque de production de virus compétents pour la réplication, propriété avantageuse dans le cadre des vecteurs de thérapie génique destinés à un usage humain.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un fragment d'ADN isolé  
30 comprenant un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) et/ou une séquence d'encapsidation, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un rétrotransposon.

Par fragment d'ADN isolé, on entend un fragment d'ADN isolé de son contexte c'est à dire non associé à une autre séquence de rétrotransposon autre que celle  
35 définie ci-dessous. Le terme "rétrotransposon" se rapporte à un élément génétique

- 4 -

cellulaire mobile qui présente des caractéristiques de type rétroviral, notamment par l'existence de répétitions directes à ses deux extrémités. Par IRES, on désigne une séquence capable de promouvoir l'entrée des ribosomes dans une molécule d'ARN d'une manière indépendante de la coiffe, au niveau d'un site interne de cet ARN.

- 5 Une séquence d'encapsidation, est une séquence impliquée dans le processus d'encapsidation des rétrovirus ou vecteurs rétroviraux en favorisant la dimérisation de deux copies du génome rétroviral et en permettant l'encapsidation du dimère dans les particules virales. Le terme "dérivé" fait référence à une structure ayant une origine rétrotransposon mais qui peut avoir subi quelques modifications, avoir  
10 été obtenue par synthèse chimique ou encore d'éléments divers comprenant des parties de retrotransposon, comme le virus HaMSV.

- Selon un mode de réalisation préféré, un fragment d'ADN selon l'invention est capable d'exercer une fonction IRES et une fonction d'encapsidation lorsqu'il est  
15 introduit dans un vecteur rétroviral approprié.

- Dans le cadre de la présente invention, un fragment d'ADN selon l'invention est isolé de l'extrémité 5' d'un rétrotransposon et notamment de la région qui suit directement la répétition directe située à son extrémité 5' (LTR-like 5') et, en  
20 particulier, le site de liaison à l'ARN transfert (PBS). Il va sans dire qu'il peut être isolé par toute technique en usage dans le domaine de l'art, par exemple par clonage à l'aide de sondes appropriées, par PCR (Polymerase Chain reaction) ou encore synthèse chimique. Aux fins de la présente invention, il comprend au moins 100 nucléotides de ladite région, avantageusement au moins 200 nucléotides, de  
25 préférence au moins 300 nucléotides, de manière préférée au moins 400 nucléotides et, de manière tout à fait préférée, au moins 550 nucléotides, ceci en comptant les nucléotides hors la répétition directe en 5'. Mais, bien entendu, il peut s'étendre au delà dans la direction 3' jusqu'à au plus 0,88 à 1,5 kb.

- 30 Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, un fragment d'ADN selon l'invention, est dérivé d'un élément VL30 de rongeur, de préférence, d'origine murine et, tout particulièrement, de rat ou de souris. S'agissant de la première variante selon laquelle un fragment d'ADN est isolé d'un VL30 de rat, on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un fragment d'ADN ayant une séquence  
35 substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de

- 5 -

séquence SEQ ID NO: 1, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 590 ou, de manière optionnelle, commençant au nucléotide 176 et se terminant au nucléotide 590.

- 5 Selon la deuxième variante (fragment d'ADN isolé d'un VL30 de souris), on aura de préférence recours à un fragment d'ADN présentant une séquence substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 788.

10

Le terme substantiellement homologue fait référence à un degré d'homologie supérieur à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90% et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 95%. Ainsi, un fragment d'ADN selon l'invention peut avoir une séquence légèrement différente d'une des  
15 séquences décrites dans les identificateurs de séquence 1 et 2, à la condition toutefois que la substitution, la délétion ou l'addition d'un ou plusieurs nucléotides n'affecte pas sa fonction IRES et/ou la fonction d'encapsulation.

D'une manière générale, un fragment d'ADN selon l'invention est destiné à être  
20 intégré (dans une orientation quelconque) dans un vecteur de transfert et d'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt. Le choix d'un tel vecteur est large et les techniques de clonage dans le vecteur retenu sont à la portée de l'homme de l'art. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, on peut envisager un vecteur plasmidique ou un vecteur dérivé d'un virus animal et, en  
25 particulier, d'un poxvirus (canari pox ou virus de la vaccine), adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus ou rétrovirus. De tels vecteurs sont largement décrits dans la littérature. En particulier, lorsqu'il s'agit d'un vecteur adénoviral, celui-ci peut être issu d'un adénovirus humain, de préférence de type 2 ou 5, animal, de préférence canin ou aviaire, ou encore d'un  
30 hybride entre des espèces variées. La technologie générale concernant les adénovirus est divulguée dans Graham et Prevec (1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene transfer and Expression Protocols ; Ed E.J. Murray, the human Press Inc, 109-118).

35 Dans le cadre de la présente invention, un fragment d'ADN selon l'invention est



- 6 -

de préférence positionné en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel celui-ci code. Il peut être inclus dans une cassette d'expression de type monocistronique (pour l'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur) ou polycistronique (pour l'expression d'au moins deux gènes d'intérêt placés sous le contrôle d'un même promoteur). Cette dernière peut contenir plusieurs éléments en tandem "site IRES-gène d'intérêt" dont au moins un des sites IRES est constitué par un fragment d'ADN selon l'invention. On préfère tout particulièrement le mettre en oeuvre dans une cassette dicistronique dans laquelle il peut être inséré soit en amont du premier gène d'intérêt soit en amont du second, cette dernière variante étant la préférée.

Lorsqu'un vecteur selon l'invention comprend plusieurs cassettes d'expression, celles-ci peuvent être insérées dans une orientation quelconque les unes par rapport aux autres ; dans une même orientation (promoteur agissant dans une même direction) ou en orientation réverse (promoteur agissant dans une orientation opposée).

Dans le cas où un vecteur selon l'invention comprend plusieurs fragments d'ADN selon l'invention, il est préférable qu'ils soient issus de rétrotransposons d'origines différentes. Selon ce mode de réalisation particulier, on préfère qu'un des fragments soit dérivé d'un VL30 de rat et présente notamment une séquence substantiellement homologue à la SEQ ID NO: 1 et que l'autre soit dérivé d'un VL30 de souris et présente notamment une séquence substantiellement homologue à la SEQ ID NO: 2.

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, un vecteur selon l'invention dérive d'un rétrovirus. On peut citer à titre d'exemples, les rétrovirus aviaires tels que le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV), le virus de la leucémie aviaire (AVL), le virus du sarcome aviaire (ASV), le virus de la nécrose de la rate (SNV) et le virus du sarcome de Rous (RSV), les rétrovirus bovins, les rétrovirus félins, les rétrovirus murins tels que le virus de la leucémie murine (MuLV), le virus de Friend (F-MLV) et le virus du sarcome murin (MSV) et les rétrovirus de primate. Bien entendu, d'autres rétrovirus peuvent être mis en oeuvre. Cependant, on préfère tout particulièrement avoir recours au virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV). Les nombreux vecteurs rétroviraux dérivés de ce dernier qui



sont décrits dans la littérature, notamment le vecteur N2 ou un de ses dérivés peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

Les vecteurs rétroviraux envisageables aux fins de la présente invention sont schématisés dans la Figure 1 (a, b et c). Bien entendu, ces exemples ne sont pas limitatifs. Pour plus de clarté, les LTRs 5' et 3' rétroviraux sont représentés par une boîte hachurée, les séquences de VL30 murin (indifféremment souris et/ou rat) par un trait gras, le promoteur interne par une boîte pointillée, les gènes d'intérêt par une boîte blanche et enfin la région d'encapsidation (Psi) rétrovirale par un trait fin. Comme cela est illustré, le LTR 5' rétroviral peut être utilisé comme promoteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt mais on peut également avoir recours à un promoteur interne. D'autre part, un vecteur rétroviral selon l'invention peut, de façon optionnelle, comporter une région d'encapsidation rétrovirale comme la séquence Psi du MoMuLV. Cependant, la présence de cette dernière n'est pas exigée dans la mesure où un fragment d'ADN selon l'invention peut également remplir cette fonction et ceci quelle que soit sa position dans le vecteur rétroviral de l'invention (en amont d'un gène d'intérêt et/ou en aval du LTR 5').

Aux fins de la présente invention, un gène d'intérêt en usage dans l'invention peut être obtenu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus par toute technique conventionnelle. Il est, de préférence, capable de produire un produit d'expression ayant un effet thérapeutique et il peut s'agir d'un produit homologue à la cellule hôte ou, de manière alternative, hétérologue. Le terme produit d'expression désigne une protéine ou un fragment de celle-ci. Dans le cadre de la présente invention, un gène d'intérêt peut coder pour un produit (i) intracellulaire (ii) membranaire présent à la surface de la cellule hôte ou (iii) sécrété hors de la cellule hôte. Il peut donc comprendre des éléments additionnels appropriés comme, par exemple, une séquence codant pour un signal de sécrétion. Ces signaux sont connus de l'homme de l'art.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un gène d'intérêt peut coder pour une protéine correspondant à tout ou partie d'une protéine native telle que trouvée dans la nature. Il peut également s'agir d'une protéine chimérique, par exemple provenant de la fusion de polypeptide d'origines diverses ou d'un mutant

- 8 -

présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par des techniques de biologie classiques par substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs résidus acides aminés.

- 5 On préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un produit d'expression capable d'inhiber ou retarder l'établissement et/ou le développement d'une maladie génétique ou acquise. Un vecteur selon l'invention est particulièrement destiné à la prévention ou au traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie A ou B, de la myopathie de Duchenne ou de
- 10 Becker, du cancer, du SIDA et d'autres bactéries ou maladies infectieuses dues à un organisme pathogène : virus, bactérie, parasite ou prion. Les gènes d'intérêt utilisables dans la présente invention, sont ceux qui codent pour les protéines suivantes :
- 15 - une cytokine et notamment une interleukine, un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF),
- 20 - un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur IX, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,
- une enzyme et notamment la trypsine, une ribonucléase et la  $\beta$ -galactosidase,
- 25 - un inhibiteur d'enzyme tel que l' $\alpha$ 1-antitrypsine et les inhibiteurs de protéases virales
- 30 - un produit d'expression d'un gène suicide comme la thymidine kinase du virus HSV (virus de l'herpès) de type 1,
- un activateur ou un inhibiteur de canaux ioniques,
- 35 - une protéine dont l'absence, la modification ou la dérégulation de l'expression est responsable d'une maladie génétique, telle que la protéine

- 9 -

CFTR, la dystrophine ou minidystrophine, l'insuline, l'ADA (adénosine diaminose), la glucocérébrosidase et la phénylhydroxylase,

- une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, telle qu'un produit d'expression de gènes supresseurs de tumeurs (gènes p53, Rb...), une toxine, un anticorps, une immunotoxine,
  - une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire, et
  - une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple un épitope antigénique du virus en cause, un anticorps ou un variant altéré d'une protéine virale susceptible d'entrer en compétition avec la protéine virale native.
- 15 Par ailleurs, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut également coder pour un marqueur de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules hôtes transfectées par un vecteur selon l'invention. On peut citer le gène *neo* (néomycine) conférant une résistance à l'antibiotique G418, le gène *dhfr* (dihydrofolate réductase), le gène CAT (Chloramphenicol Acethyl Transférase) ou
- 20 encore le gène *gpt* (xanthine phosphoribosyl).
- D'une manière générale, on aura recours pour l'expression d'un ou des gène(s) d'intérêt à un promoteur fonctionnel dans la cellule hôte considérée et, de préférence, une cellule humaine. Le choix du promoteur est très large et à la portée
- 25 de l'homme du métier. Il peut s'agir d'un promoteur gouvemant naturellement l'expression d'un gène d'intérêt en usage dans la présente invention ou de tout autre promoteur (d'origine eucaryote ou viral). Par ailleurs, il peut être de nature ubiquitaire ou régulable, notamment en réponse à certains signaux cellulaires tissu-spécifiques ou événements-spécifiques. A titre indicatif, il peut être avantageux de
- 30 mettre en oeuvre un promoteur tissu-spécifique lorsque l'on veut cibler l'expression du ou des gène(s) d'intérêt dans une cellule ou un type cellulaire particulier, par exemple les lymphocytes dans le cadre du SIDA, les cellules pulmonaires dans le cadre de la mucoviscidose ou les cellules musculaires dans le cadre des myopathies.

- 10 -

A titres d'exemples non limitatifs, on peut citer notamment les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxyméthyl-Glutaryl Coenzyme A), TK (Thymidine kinase), les LTRs rétroviraux et, en particulier, celui du MoMuLV ou du MSV lorsqu'on met en oeuvre un vecteur rétroviral, le promoteur tardif MPL (Major Late Promoteur) d'adénovirus de type 2 notamment dans le contexte d'un vecteur adénoviral, les promoteurs 7,5K et H5R notamment destinés à des vecteurs dérivés de poxvirus et surtout du virus de la vaccine, le promoteur PGK (Phosphoglycéro kinase), les promoteurs foie-spécifiques des gènes codant pour l' $\alpha$ 1-antitrypsine, le facteur IX, l'albumine et la transferrine, les promoteurs des gènes d'immunoglobulines qui permettent une expression dans les lymphocytes, et enfin les promoteurs des gènes codant pour le surfactant ou la protéine CFTR qui présentent une certaine spécificité pour les tissus pulmonaires.

Par ailleurs, une cassette d'expression présente dans un vecteur selon l'invention peut comporter d'autres séquences nécessaires à l'expression du ou des gène(s) d'intérêt, tant au niveau de la transcription que de la traduction ; par exemple des séquences activatrices de la transcription de type enhancer, des introns, des signaux de terminaison de la transcription et, comme indiqué précédemment, un signal de sécrétion.

L'invention couvre également les virus et particules virales obtenus par transfection du vecteur viral selon l'invention dans une lignée de complémentation adéquate. Selon le type de vecteur viral utilisé, l'homme du métier connaît les lignées de complémentation pouvant être employées pour générer des particules virales infectieuses ainsi que le procédé à mettre en oeuvre. S'agissant d'un vecteur adénoviral, on peut avoir recours à la lignée 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72).

Dans le cadre d'un vecteur rétroviral selon l'invention, on peut envisager d'employer des lignées cellulaires écotropiques, comme la lignée CRE (Danos et Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460-6464) ou GP+E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., 62, 1120-1124). Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une lignée de complémentation amphotropique telle que la lignée PG13 (Miller et al., 1991, J. Virol., 65, 2220-2224) ou Psi Env-am (Markowitz et al., 1988, T.A.A.P. Vol. CI, 212-218). Généralement, on

- 11 -

recupère les particules virales infectieuses dans le surnageant de culture des cellules de complémentation transfectées par un vecteur rétroviral selon l'invention.

L'invention s'étend également aux cellules eucaryotes comprenant un fragment  
5 d'ADN selon l'invention. Elles peuvent être obtenues par infection par des  
particules virales infectieuses selon l'invention ou par introduction d'un vecteur  
plasmidique ou viral soit *in vitro* (dans une cellule prélevée d'un patient ou d'un  
animal) soit directement *in vivo*. Les méthodes pour introduire un vecteur dans une  
cellule sont conventionnelles. On peut mettre en oeuvre la technique de  
10 précipitation au phosphate de calcium, celle au DEAE dextrane, l'injection directe  
du vecteur ou d'une portion de celui-ci dans une cellule ou encore l'encapsulation  
dans des molécules de type liposomes. D'autre part, les vecteurs selon l'invention  
peuvent être présents dans la cellule hôte soit sous forme intégrée dans le génome  
cellulaire ou sous forme épisomale aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme  
15 de la cellule. La cellule selon l'invention est avantageusement une cellule  
mammifère et, de préférence, une cellule humaine.

La présente invention concerne également l'usage thérapeutique d'un vecteur ou  
d'une cellule selon l'invention, pour la préparation d'une composition  
20 pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie  
génétique ou d'une maladie acquise comme le cancer ou une maladie infectieuse.  
Cependant, un tel usage n'est pas limité à une application de type thérapie génique  
somatique. En particulier, un vecteur selon l'invention peut être utilisé à d'autres  
fins comme la production par voie recombinante dans des cellules eucaryotes de  
25 produits d'expression destinés à être inclus après purification dans ladite  
composition pharmaceutique.

L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant à  
titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur ou une cellule selon  
30 l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue  
pharmaceutique.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière  
conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace  
35 d'un tel agent à un support, un diluant ou un adjuvant acceptable. Elle peut être

- 12 -

- administrée selon n'importe quelle route d'administration et ceci en dose unique ou répétée après un certain délai d'intervalle. La quantité à administrer sera choisie en fonction de différents critères, en particulier l'usage à titre de traitement ou de vaccin, la voie d'administration, le patient, le type de maladie à traiter et son état d'évolution, la durée du traitement....etc. A titre indicatif, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu (unité formant des plages), avantageusement entre  $10^5$  et  $10^{13}$  pfu et, de préférence, entre  $10^6$  et  $10^{11}$  pfu de particules virales.
- 10 Par ailleurs, l'invention concerne une méthode de traitement de maladies génétiques, cancers et maladies infectieuses selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur ou d'une cellule selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement. Selon un premier protocole thérapeutique, on peut les administrer directement *in vivo*, par exemple par
- 15 injection intraveineuse, intramusculaire ou par aérosolisation dans les poumons. De manière alternative, on peut adopter un protocole de thérapie génique *ex vivo* qui consiste à prélever les cellules d'un patient, cellules souches de la moelle osseuse ou lymphocytes du sang périphérique, à les transfecter avec un vecteur selon l'invention et à les cultiver *in vitro* avant de les réimplanter au patient.
- 20 L'invention concerne également un fragment d'ADN isolé comportant une séquence d'encapsidation (Psi) dérivée d'un virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV) à titre de site interne d'entrée des ribosomes (IRES) et sa mise en oeuvre dans le cadre de vecteurs d'expression tels que ceux mentionnés
- 25 précédemment et, en particulier, de vecteurs rétroviraux. Il s'agira d'un vecteur polycistronique comprenant, de préférence, deux gènes d'intérêt sous le contrôle d'un même promoteur et présentant une séquence Psi de MoMuLV entre les deux gènes. Le vecteur peut inclure des gènes d'intérêt supplémentaires, soit sous la forme d'une cassette polycistronique (plusieurs éléments en tandem "IRES-gène
- 30 d'intérêt" dont au moins un IRES est constitué par une séquence Psi dérivant du MoMuLV), soit sous la forme d'une cassette indépendante pourvue de son propre promoteur. Bien entendu, l'invention couvre également les particules virales et les cellules eucaryotes comprenant un tel vecteur, leur usage thérapeutique ainsi qu'une composition pharmaceutique. On indique qu'un site IRES selon l'invention est, de
- 35 préférence, porté par les séquences s'étendant des nucléotides 210 à 1035 du

- 13 -

génom MoMuLV (+ 1, représentant le site d'initiation de la transcription).

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

- 5 La Figure 1 représente quelques vecteurs rétroviraux utilisables dans le cadre de l'invention a : de type monocistronique, b : de type dicistronique et c : de type mixte comprenant des cassettes d'expression mono et dicistroniques. Les LTRs 5' et 3' sont représentés par une boîte hachurée, les séquences de VL30 murin (rat ou souris) par un trait gras, la séquence Psi rétrovirale par un trait fin, le  
10 promoteur interne par une boîte pointillée et enfin les gènes d'intérêt par une boîte blanche.

La Figure 2 schématise les vecteurs pVL-CT2, pCBT1, pCBT2, pMLV-LacZ+, pSJE1 et pSJE2.

15

La Figure 3 schématise les vecteurs pMLV-CBT, pVL-CBT2-E\* et pVL-CBT5 (plap représente le gène phosphatase alcaline désigné ci-après PA).

## 20 EXEMPLES

Les constructions ci-après décrites sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,  
25 NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Le remplissage des extrémités 5' protubérantes peut être réalisé à l'aide du fragment Klenow de l'ADN polymérase d'E. coli et la destruction des extrémités 3' protubérantes en présence de l'ADN polymérase du phage T4. Les techniques de PCR sont connues de l'homme de l'art et abondamment décrites dans  
30 PCR Protocols, a guide to methods and applications (Ed : Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press, Inc.).

Par ailleurs, la position des séquences du VL30 de rat et de souris est indiquée par référence à la molécule ARN, la position + 1 correspondant au premier nucléotide  
35 de la molécule d'ARN, c'est à dire au site d'initiation de la transcription dans la



- 14 -

molécule ADN (premier nucléotide de la séquence R). En ce qui concerne les séquences VL30 de souris, les positions ARN 362-575 et 362-1149 correspondent respectivement aux positions ADN 631-844 et 631-1418 de la séquence décrite dans Adams et al. (1988, Mol. Cell. Biol., 8, 2989-2998)

5

EXEMPLE 1 : Etudes d'expression *in vitro*

1. *Construction des vecteurs d'expression*

10

Le vecteur pCB28 est obtenu de la façon suivante :

Le fragment EcoRI-NheI de pLNPOZ (Adam et al., 1991, J. Virol. 65, 4985-4990) est cloné dans le Bluescript II KS+ digéré par EcoRI et SpeI pour donner  
15 pCB25. Le fragment HindIII-XbaI de pCB25 contenant les séquences codant pour la néomycine (néo), le site IRES du poliovirus et le gène  $\beta$ -galactosidase (LacZ) est cloné dans le vecteur pRc/CMV (Invitrogen) délété des positions 1284 à 3253 et digéré par HindIII et XbaI. Un fragment portant les séquences virales du virus F-MLV des positions 1 à 651 est généré par PCR à l'aide des amorces 6 et 7 (SEQ  
20 ID NO: 3 et 4). On peut utiliser à titre de matrice une préparation d'ADN obtenu de ce virus par les techniques classiques. Le fragment PCR est digéré par XhoI et BamHI puis inséré entre les gènes néo et LacZ de pCB27 partiellement digéré par XhoI et BamHI.

25 Puis on insère entre les gènes néo et LacZ de pCB28 (également décrit dans Berlioz et Darlix, 1995, J. Virol. 69, 2214-2222) linéarisé par NheI, une série de fragments portant des séquences VL30 de taille déterminée, respectivement :

- des positions 1 à 794,
- 30 - des positions 205 à 794, et
- des positions 380 à 794.

Les séquences VL30 ont été générées par PCR à partir de la matrice pVL-CG20 (Torrent et al., 1994, J. Virol. 68, 661-667). Il est à la portée de l'homme de l'art  
35 de concevoir des amorces appropriées à partir des données de séquences et

- 15 -

pourvues en outre d'un site *NheI* à leurs extrémités (à cet égard les oligonucléotides décrits dans les SEQ ID NO: 7 et 8 peuvent convenir pour les positions 205 à 794). On obtient pVL-D1-794, pVL-D205-794 et pVL-D380-794 selon la séquence VL30 insérée.

5

Dans tous ces vecteurs, la cassette dicistronique néo-VL30-LacZ est sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase T7 pour l'expression *in vitro* et du promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV) pour l'expression dans les cellules eucaryotes. On indique que l'AUG initiateur du gène lacZ est placé dans un

10 contexte favorable à l'initiation de la traduction selon la règle de Kozak (A/G CCAUGG ; Kozak, 1986, Cell 44, 283-292).

## 2. Traduction *in vitro* des ARNs dicistroniques

15 On génère des ARNs dicistroniques par synthèse *in vitro* à partir de 5 µg de plasmides recombinants pVL linéarisés par *XbaI*. La réaction de transcription se déroule 3 h à 37°C dans 0,1 ml de 40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 10 mM dithiothreitol, 10 mM NaCl, 0,5 mM de chacun des ribonucléosides triphosphate en présence de 40 U d'ARN polymérase T7 et 80 U

20 de RNAsine (inhibiteur de RNase). Après un traitement à la DNase (RQ1), les ARNs sont extraits au phenol-chloroforme et précipités à l'éthanol. Ils sont ensuite redissous dans de l'eau stérile bidistillée et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier leur intégrité (bande unique migrant à la taille attendue de 4,6 à 5 kb selon les plasmides).

25

Les ARNs dicistroniques (10 µg d'ARN/ml) sont ensuite traduits *in vitro* dans un système de lysats de réticulocytes de lapin (système RRL, Proméga) à 50 % de sa concentration d'origine en présence de 1 mCi [<sup>35</sup>S] méthionine/ml (Amersham) (temps de réaction 1h à 31°C). Le mélange réactionnel est supplémenté en acétate

30 de potassium et en chlorure de potassium à une concentration finale de 60 mM et 40 mM respectivement.

Les tubes sont placés à 100°C dans 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % glycérol, 5 % β-mercaptoéthanol et 0,02 % de bleu de bromophenol et les

35 protéines marquées au <sup>35</sup>S sont analysées par électrophorèse sur gel de

- 16 -

polyacrylamide 10 % - 0,2 % SDS. La quantification des produits de traduction des gènes néo et LacZ est effectuée par scanning. La protéine néo sert de standardisation du niveau de traduction et on évalue la quantité de  $\beta$  galactosidase synthétisée (PM 110 kDa).

5

Les ARN produits à partir de chacun des vecteurs permettent la synthèse des produits d'expression des deux gènes (néo et  $\beta$  galactosidase) ce qui indique qu'ils sont dicistroniques et suggère l'existence d'un IRES dans les séquences VL30 mises en oeuvre, assurant l'initiation de la traduction du second cistron d'où la

10 production de  $\beta$ -galactosidase.

Lorsqu'on examine la réaction d'une manière quantitative, le ratio  $\beta$ gal/néo est similaire pour les vecteurs pVL-D1-794 et pVL-D205-794. Il semble donc que les séquences 1-205 du VL30 ont peu d'influence sur le mécanisme d'initiation de la

15

traduction. De manière intéressante avec le vecteur pVL-D380-794, le niveau de synthèse de la  $\beta$ -galactosidase est plus élevé. Ces expériences suggèrent que les séquences 380 à 794 du VL30 de rat ont la capacité d'initier la traduction d'un cistron en 3' via un mécanisme d'entrée interne des ribosomes.

20

EXEMPLE 2 : Vecteurs rétroviraux comprenant une séquence d'un VL30 de rat.

1. *Construction des vecteurs dicistroniques*

25

Le plasmide pCB71 est obtenu de la façon suivante :

Un fragment EcoRI-XbaI est isolé du plasmide Cla12-AP et cloné entre les mêmes sites du Bluescript II KS+ (Stratagène) pour générer pCB70. Ce fragment comprend le gène de la phosphatase alcaline humaine (PA) décrit dans l'art

30

antérieur (Fekete et Cepko, 1993, Mol. Cell. Biol., 13, 2604-2613). L'introduction de sites de restriction adéquates est à la portée de l'homme du métier.

En parallèle, le gène de la néomycine (néo ; positions 4 à 844) est amplifié par PCR à partir du vecteur pLNPOZ (Adam et al., 1991, *supra*) et à l'aide des

35

amorces 10 et 11 (SEQ ID NO: 5 et 6) munies à leurs extrémités de sites de

- 17 -

restriction Sall, SpeI et BamHI. Le fragment PCR généré est digéré par Sall et BamHI et introduit avec le fragment EcoRV-Sall de pCB70 portant le gène de la phosphatase alcaline dans le vecteur pLNPOZ digéré par Ball et BamHI.

- 5 On isole par PCR un fragment d'ADN de 0,59 kb comportant les séquences du VL30 de rat (positions 205 à 794) et muni à ses extrémités 5' et 3' d'un site NheI. On met en oeuvre le plasmide pVL-CG20 (Torrent et al., 1994, *supra*) à titre de matrice et les oligonucléotides 12 et 13 reportés dans les SEQ ID NO: 7 et 8. Le fragment PCR est digéré par NheI avant d'être inséré dans le vecteur pCB71 digéré
- 10 par SpeI, pour donner pCBT2. A titre indicatif, on a inclus dans l'oligonucléotide 13 un codon ATG initiateur de la traduction placé dans un contexte favorable de Kozak (A/GCCATGG) qui permettra ensuite d'introduire une séquence codante dépourvue de codon initiateur.
- 15 La construction finale pCBT2 (Figure 2) contient le LTR 5' du MoMuLV, le gène de la phosphatase alcaline humaine, un fragment de 0,59 kb isolé du VL30 de rat (positions 205 à 794) suivi du gène néomycine et du LTR 3' du MoMuLV.

La construction du plasmide pCBT1 s'effectue de la façon comme suit :

20

Un fragment d'ADN comportant les séquences VL30 de rat (positions 205 à 379) est généré par PCR à partir du vecteur pVL-CG20 et des oligonucléotides 8 et 9 (SEQ ID NO: 9 et 10). Après digestion par NheI, celui-ci est inséré dans le vecteur pCB28 également clivé par NheI, pour donner pCB57. Ce fragment NheI

25 est isolé de pCB57 et introduit dans le vecteur pCB71 digéré par SpeI. Comme précédemment, ce fragment comporte un codon initiateur de la traduction placé dans un contexte Kozak. On génère pCBT1 (Figure 2) identique à pCBT2 à l'exception de la longueur du fragment VL30 de rat (0,175 kb au lieu de 0,59 kb).

30 2. Construction du vecteur monocistronique pVL-CT2

On isole par PCR un fragment d'ADN comportant les séquences d'HaMSV (position + 1 à + 794) muni à son extrémité 3' d'un site NcoI. On met en oeuvre le plasmide pVL-CG20 (Torrent *et al*, 1994, *supra*) à titre de matrice et les

35 oligonucléotides 16 et 13 reportés dans les SEQ ID NO: 11 et 8. Le fragment PCR

- 18 -

est digéré par SmaI et NcoI avant d'être inséré dans le vecteur pLNPOZ (Adam et al., 1991, *supra*) digéré par NcoI et partiellement par SmaI, pour donner pVL-CT2 (Figure 2).

5 3. *Génération de particules virales infectieuses et détermination du taux d'encapsidation et du taux d'expression des gènes néo, phosphatase alcaline et LacZ*

La lignée de complémentation écotrope GP+E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., 62, 1120-1124) et les cellules cibles NIH3T3 (cellules fibroblastiques de souris) disponibles à l'ATCC, sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complémenté avec 5% de sérum de veau de nouveau-né. La veille de la transfection et de l'infection, les cellules GP+E-86 et les cellules cibles NIH3T3 sont mises en culture à raison  
10 de 5x10<sup>5</sup> cellules par boîte de 10cm et 1,5x10<sup>5</sup> cellules par puit, respectivement. Les infections virales sont réalisées selon le protocole conventionnel décrit dans la littérature. La méthode de titration est celle dite du point de dilution limite.

Les vecteurs pCBT1, pCBT2 et pVL-CT2 ainsi que le vecteur de référence pMLV-LacZ (Torrent et al, 1994, *supra*) sont transfectés en parallèle dans les cellules GP+E-86 selon la méthode de Chen et Okyama (1987, Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2753). Le jour suivant (J+1), les cellules sont lavées selon les méthodes de l'art et on récolte le surnageant de culture à J+2. Différentes dilutions sont utilisées pour infecter les cellules cibles NIH3T3. Les cellules sont cultivées en milieu  
20 sélectif (800 µg/ml de G418) 24 heures après la transfection ou l'infection.

On mesure sur une aliquote de culture de cellules infectées et transfectées par pMLV-LacZ et pVL-CT2, l'expression du gène LacZ après coloration X-Gal. Cette technique de coloration est décrite dans les ouvrages de base accessibles à  
30 l'homme du métier. Il est également possible d'utiliser un kit commercial (Promega).

De même, on détermine régulièrement au cours du temps, la production de la phosphatase alcaline dans les cellules GP+E-86 transfectées et dans les cellules  
35 NIH3T3 infectées par pCBT1 et pCBT2. Pour ce faire, les cellules sont rincées

- 19 -

dans du tampon PBS 1 et fixées 5 min à température ambiante avec une solution contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde dans du PBS x 1. Les cellules ont ensuite rincées deux fois dans du tampon PBS x 1 puis incubées 30 min à 65°C dans du PBS x 1. Elles sont lavées dans du tampon AP (0,1 M Tris-HCl  
5 pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Ce tampon est ensuite remplacé par la solution de coloration (contenant 0,1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 1, 1 mg/ml de Nitoblue sel de térazolium 1, Levamisol 1 mM dans du tampon AP). les cellules sont incubées 6 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Les cellules colorées correspondent aux cellules phosphatase positives.

10

Le taux d'encapsulation de chacun des vecteurs est estimé en calculant le rapport nombre de cellules infectées colorées (PA ou LacZ positives) sur le nombre de cellules transfectées colorées (PA ou LacZ positives) x 100. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 1 suivant.

15

Tableau 1

	PLASMIDES	TAUX D'ENCAPSIDATION
20	pMLV-Lac Z <sup>+</sup>	100
	pVL-CT2	170
	pCBT1	1,8
25	pCBT2	100

Les données indiquent que le fragment d'ADN de VL30 de rat (positions 205 à 794) comprend un signal d'encapsulation au moins aussi efficace que la séquence  
30 Psi du MoMuLV. De manière surprenante, la localisation de la séquence VL30 de rat entre deux gènes affecte peu l'efficacité d'encapsulation du génome rétroviral (vecteur pCBT2 comparé à pVL-CT2).

D'autre part, lorsque l'on suit l'expression des gènes PA et néo au cours du temps,  
35 la grande majorité des cellules exprimant le gène néo (résistance au G418)

- 20 -

expriment simultanément le gène phosphatase. L'expression des deux gènes est stable au cours du temps, puisque plus de 90% des cellules résistantes au G418 sont également phosphatase positives après 40 jours de culture en milieu sélectif.

5 4. *Analyse des ARN*

- Des cellules à confluence sont lavées (PBS 1X) puis incubées 1 heure à 37°C dans un tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH8,8 ; 0,3M NaCl ; 0,5% SDS ; 0,1%  $\beta$ -mercapto-éthanol ; 100 $\mu$ g/ml protéinase K). Le lysat est extrait deux fois au
- 10 phénol. Les acides nucléiques sont ensuite précipités en présence de 2,5 volumes d'éthanol froid. Le précipité d'ADN est récupéré à l'aide d'une baguette en verre alors que les ARNs sont précipités 1 heure à -20°C puis centrifugés 30 minutes à 10000 rpm à 4°C. L'ARN cellulaire purifié est repris dans 150  $\mu$ l d'eau stérile.
- 15 Les ARNs cellulaires totaux sont incubés à 65°C pendant 5 min dans un tampon MOPS (20mM acide morpholinopropanesulfonique, 5mM acétate de sodium, 1mM EDTA, pH7) contenant 6% formaldéhyde, 50% formamide, 30% bleu glycérol. Les ARNs dénaturés sont déposés sur gel agarose 0,7% en condition dénaturante (MOPS 1X, 6% formaldéhyde). Les ARNs sont ensuite transférés sur membrane
- 20 de nitrocellulose dans un tampon phosphate de sodium 25mM pendant 1 heure 30 min à 800mA. La membrane est exposée sous les UV (252 nm ; 0,32 J/cm<sup>2</sup>) pour fixer les ARNs. Puis, la membrane est incubée 4 heures à 42°C dans une solution de préhybridation (50% formamide, 1M NaCl, 50mM NaPO<sub>4</sub> pH7, 10% Dextran sulfate, 1% SDS, 250 $\mu$ g/ml ADN de sperme de saumon dénaturé 5 min à 100°C).
- 25 La membrane est ensuite hybridée pendant 14 heures à 42°C en 50% formamide, 0,8M NaCl, 50mM NaPO<sub>4</sub> pH7, 10% Dextran sulfate et 1% SDS. La sonde néomycine utilisée à 0,5.10<sup>9</sup> cpm/ $\mu$ g est dénaturée 5 min à 100°C et ajoutée à la solution d'hybridation. Après hybridation, la membrane est lavée dans des bains successifs : 2 x SSC, 1% SDS (2 fois 10 min, température ambiante), 2 x SSC,
- 30 0,1% SDS (30 min, 65°C) et 1 x SSC, 0,1% SDS (30 min, 65°C). La membrane est ensuite séchée et exposée à -80°C pendant 72 heures.

La sonde néomycine est complémentaire du gène de la néomycine entre les positions 213 et 596 et correspond au fragment PstI-NcoI de pLNPOZ (Adam *et*

35 *al.*, 1991). La sonde a été marquée par extension d'amorce avec le kit Nonaprimer



- 21 -

kit I (Appligene).

Les ARNs cellulaires ont été extraits de cellules GP+E-86 72 heures après transfection du plasmide pCBT2, ou bien de cellules NIH3T3 infectées avec des virions pCBT2 après 30 jours de sélection. L'hybridation de ces ARNs avec une sonde complémentaire du gène néo révèle la présence d'un seul ARN dicistronique de taille identique dans les cellules transfectées et infectées. En conséquence, l'expression simultanée des gènes phosphatase et néomycine dans 90-95% des cellules infectées après 30 jours de sélection est due à la présence d'un seul ARN dicistronique.

5. *Vecteur rétroviral dicistronique contenant deux signaux d'encapsulation.*

Cet exemple décrit la construction de vecteurs dicistroniques contenant un signal d'encapsulation en position normale (en aval du LTR 5') et le second entre deux cistrons. On génère deux vecteurs rétroviraux (1) pVL-CBT2-E\* dans lequel le signal MoMuLV est placé en aval du LTR 5' et la séquence VL30 de rat (205-794) entre les gènes codant pour la phosphatase alcaline et néo et (2) pVL-CBT5 dans lequel leurs positions respectives sont inversées.

pVL-CBT2-E\* résulte du clonage du fragment EcoRI isolé de pLNPOZ (Adam et al., 1991, *supra*) portant les séquences LTR 5' et d'encapsulation du MoMuLV dans pCBT2 préalablement digéré par ce même enzyme (Figure 3).

pVL-CBT5 est obtenu de la façon suivante : les séquences correspondant au LTR 5' de MoMuLV suivi des séquences VL30 (positions 205 à 794) sont amplifiées par PCR à partir de la matrice pVL-CT2. Il est à la portée de l'homme de l'art de déterminer les amorces qui conviennent et de les pourvoir de sites EcoRI à leurs extrémités 5'. Le fragment amplifié est digéré par EcoRI et cloné dans le vecteur pMLV-CTB (voir ci-après) également traité par EcoRI pour donner pVL-CBT5 (Figure 3).

6. *Vecteur rétroviral dicistronique comportant le signal d'encapsulation de MoMuLV en position centrale.*

35

- 22 -

On construit l'équivalent de pCBT2 à la différence que le signal d'encapsidation de MoMuLV (positions 210 à 1035) remplace celui de VL30 de rat. Il est isolé du vecteur pLNPOZ par PCR à l'aide d'amorces adéquates comportant à leurs extrémités un site NheI. Après digestion NheI, le fragment amplifié est introduit  
 5 entre les gènes PA et neo de pMLV-CB71 (Berlioz et Darlix, 1995, J. Virol. 69, 2214-2222) digéré par SpeI. On obtient pMLV-CBT (Figure 3).

7. *Evaluation des fonctions d'encapsidation et IRES des vecteurs pMLV-CBT2-E\*, pVL-CBT5 et pMLV-CBT*

Les titres viraux sont déterminés de manière transitoire ou stable selon la technologie appliquée précédemment par évaluation du nombre de cellules exprimant la phosphatase alcaline. Les résultats sont indiqués dans le tableau 2  
 10 suivant et comparés au vecteur dicistronique pCBT2.

Tableau 2

Vecteurs	Titres viraux (PA* cfu/ml)	
	Expression transitoire	Expression long-terme
20 pCBT2	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
pMLV-CBT	$2,5 \times 10^4$	$2 \times 10^5$
pVL-CBT2-E+	$3 \times 10^4$	$4 \times 10^5$
pVL-CBT5	$2,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$

25 Ces données indiquent que la présence de deux signaux d'encapsidation dans un vecteur recombinant n'a pas d'effet (pMLV-CBT comparé à pVL-CBT5) ou un effet modéré (pCBT2 comparé à pVL-CBT2-E\*) sur le titre viral par rapport à un vecteur n'ayant qu'un signal. On observe également que la position de ces signaux au sein du génome rétroviral peut influencer leur capacité d'encapsidation (pVL-  
 30 CBT2-E\* comparé à pVL-CBT5) bien qu'à un faible degré. A cet égard, la combinaison "signal MoMuLV en position normale et VL30 entre les deux cistrons" semble plus efficace.

Les cellules GP + E-86 sont transfectées avec chacun des vecteurs rétroviraux et on  
 35 évalue les niveaux d'expression du gène PA en présence et en absence de

- 23 -

néomycine. Les cellules résistantes à la néomycine et PA positives sont dénombrées après 15 jours de sélection. Les valeurs obtenues sont légèrement plus importantes pour les vecteurs dicistroniques portant les deux signaux d'encapsidation que pour leurs homologues n'en portant qu'un, ce qui suggère que la présence de deux  
5 séquences d'encapsidation, l'une d'origine rétrovirale et l'autre de VL30 n'influence pas l'expression génique des cistrons. Par ailleurs, dans tous les cas, l'expression du gène néo est efficace. Or elle ne peut être obtenue que par initiation interne de la traduction des ARNs dicistroniques médiée par les séquences précédant le cistron néomycine, soit VL30 (pCBT2 ou pVL-CBT2-E\*) ou la région  
10 d'encapsidation du MoMuLV (pMLV-CBT et pVL-CBT5).

En conclusion, ces expériences montrent que les séquences 5' VL30 et MoMuLV sont toutes deux capables de promouvoir l'encapsidation d'un vecteur rétroviral et l'initiation de la traduction d'un cistron placé en aval.  
15

**EXEMPLE 3 : Vecteur rétroviral comprenant une séquence d'encapsidation isolée d'un VL30 de souris.**

20 1. *Construction des vecteurs*

Un fragment d'ADN contenant la séquence VL30 de souris (positions 362 à 1149) est amplifié par PCR à partir du vecteur pKT403 (Adams et al, 1988, *supra*) et à l'aide des amorces oligonucléotidiques 3 et 4 (SEQ ID NO: 12 et 13). Le fragment  
25 généré est digéré par Ball et NcoI avant d'être inséré entre les mêmes sites du vecteur pLNPOZ (Adam et al., 1991, *supra*). On obtient le vecteur pSJE2.

Par ailleurs, un fragment d'ADN comprenant une séquence plus courte de VL30 de souris (positions 362-575) également obtenu par PCR à partir de la matrice  
30 pKT403 et des oligonucléotides 1 et 2 (SEQ ID NO: 14 et 15), est introduit dans le vecteur pLNPOZ comme décrit ci-dessus. On obtient pSJE1.

Les vecteurs pSJE1 et pSJE2 comprennent le LTR 5' du MoMuLV, le fragment VL30 de souris indiqué, le gène LacZ et le LTR 3' du MoMuLV. A titre de  
35 témoin négatif, on construit le vecteur pSJE3 identique aux deux précédents mais

- 24 -

dans lequel la séquences VL30 est remplacée par un polylinker. Il est obtenu par introduction de l'oligonucléotide 5 (SEQ ID NO: 16) entre les sites *BalI* et *NcoI* de pLNPOZ.

## 5 2. Détermination du taux d'encapsidation

La technologie utilisée est comparable à celle décrite dans l'exemple 1. Brièvement, les vecteurs pSJE1, 2 et 3 sont transfectés dans des lignées murines de complémentation, GP + E-86 ou CRIP (Danos et Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460-6464). Le surnageant de culture est utilisé pour infecter les cellules cibles murines NIH3T3. On mesure l'expression du gène LacZ dans les cellules infectées et transfectées après coloration X-Gal. Le titre viral correspond au rapport nombre de cellules bleues (LacZ +) infectées sur le taux de transfection multiplié par le volume de surnageant viral utilisé. Le tableau 3 suivant donne une estimation des titres viraux obtenus pour chacun des vecteurs pSJE en fonction de la lignée de complémentation de départ. On utilise à titre de référence le vecteur pMLVLacZ+ (Torrent et al., 1994, *supra*) comprenant la région d'encapsidation conventionnelle du MoMuLV.

20

Tableau 3

PLASMIDES	TITRES SUR GP + E86 (/ml)		TITRES SUR CRIP (/ml)
	En expression transitoire	En expression long terme	En expression transitoire
pSJE1	$0,1 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$	$0,7 \times 10^4$
pSJE2	$1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$
25 pSJE3	$< 0,001 \times 10^5$	$< 0,001 \times 10^5$	$< 0,01 \times 10^4$
pMLVLacZ*	$0,85 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$7 \times 10^4$

Les résultats montrent que la séquence VL30 de souris comprise entre les nucléotides 362 et 1149 comprend une séquence d'encapsidation au moins aussi efficace que celle du MoMuLV. Une séquence VL30 plus courte (positions 362-30 575) est encore capable d'encapsidation quoiqu'à un taux plus faible. Comme

- 25 -

attendu, le vecteur pSJE3, dépourvu de toute région d'encapsidation est incapable de générer des particules virales.

Par ailleurs, lorsque l'on remplace dans le vecteur pCBT2 la séquence VL30 de rat  
5 par une des séquences VL30 de souris (soit le fragment 0,78 kb allant des positions 362 à 1149 soit le fragment 0,21 kb allant des positions 362 à 575), on mesure un taux d'encapsidation efficace et une expression correcte du gène de la phosphatase alcaline.

- 26 -

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM  
(B) RUE: 101 rue de Tolbiac  
(C) VILLE: Paris cedex 13  
(E) PAYS: France  
(F) CODE POSTAL: 75654  
(G) TELEPHONE: (1) 44 23 60 00  
(H) TELECOPIE: (1) 45 85 68 56

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveau site interne d'entree des ribosomes, vecteur le contenant et utilisation therapeutique.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 16

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 590 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Rattus  
(B) SOUCHE: element VL30 de rat

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGCAAGCCGG CCGGCGTTTG TCTTGTCTGT TGTGTCTTGT CCTGTGAACG ATCGATCAAT	60
AGGCTCAGAT CTGGGGACTA TCTGGGCGGG CCAGAGAAGG AGCTGACGAG CTCGGACTTC	120
TCCCCCGCAG CCCTGGAAGA CGTTCCAAGG GTGGTTGGAG GAGAGGGAGA TCGGGATCCG	180
TGGCACCTCC GTCCGTTTTT GGAGGGATCC GCACCCTTGA TGAATTTTTC	240
GTTTCAGTTT GGTACCGAAG CTGCGCGGCG CGCTGCTTGT TACTTGTTTG ACTGTTGGAA	300
TTGTTTGTCT TCTTTGTGAC CTGACTGTGG TTTTCTGGAC GTGTTGTGTC TGTTAGTGTC	360
TTTTTGACTT TTGTTTCGTG TTTGAATTTG GACTGACGAC TGTGTTTAAA ATCTTAGACC	420
GACGACTGTG TTTGAAATCA TGAAACTGTT TGCTTTGTTC GTCGAAGAGT TTTACTTGGT	480

- 27 -

CCCCTTAACG CTTAGTGAGT AAGAACTTA ATTTTGTAGA CCCCGCTCTA GTGGCAGTGT 540  
 GTTGGTTGAT AGCCAAAGTT AATTTTAAAA ACATAGTGTT TTGGGGGTTG 590

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 788 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
  - (B) SOUCHE: element VL30 de souris

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GATTCTTTGT TCTGTTTTGG TCTGATGTCT GTGTTCTGAT GTCTGTGTTC TGTTTCTAAG 60  
 TCTGGTGCGA TCGCAGTTTC AGTTTTGCGG ACGCTCAGTG AGACCGCGCT CCGAGAGGGA 120  
 GTGCGGGGTG GATAAGGATA GACGTGTCCA GGTGTCCACC GTCCGTTTCGC CCTGGGAGAC 180  
 GTCCCAGGAG GAACAGGGGA GGATCAGGGA CGCCTGGTGG ACCCCTTTGA AGGCCAAGAG 240  
 ACCATTTGGG GTTGCGAGAT CGTGGGTTCG AGTCCCACCT CGTGCCCAGT TGCGAGATCG 300  
 TGGGTTCGAG TCCCACCTCG TGTTTTGTTG CGAGATCGTG GGTTCGAGTC CCACCTCGCG 360  
 TCTGGTCACG GGATCGTGGG TTCGAGTCCC ACCTCGTGTT TTGTTGCGAG ATCGTGGGTT 420  
 CGAGTCCCAC CTCGCGTCTG GTCACGGGAT CGTGGGTTCG AGTCCCACCT CGTGCAGAGG 480  
 GTCTCAATTG GCCGGCCTTA GAGAGGCCAT CTGATTCTTC TGGTTTCTCT TTTTGTCTTA 540  
 GTCTCGTGTC CGCTCTTGTT GTGACTACTG TTTTCTAAA AATGGGACAA TCTGTGTCCA 600  
 CTCCCCTTTC TCTGACTCTG GTTCTGTGCG TTGGTAATTT TGTGTTGTTA CGTTTGTGTT 660  
 TGTGAGTCGT CTATGTTGTC TGTTACTATC TTGTTTTTGT TTGTGGTTTA CGGTTTCTGT 720  
 GTGTGTCTTG TGTGTCTCTT TGTGTTTCTA CTTGGACTGA TGAAGTACGA CTGTTTTTAA 780  
 GTTATGCC 788

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON



- 28 -

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Murine leukemia virus
- (B) SOUCHE: souche Friend (oligo 6)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GCTCGAGCTA GCTGCAGCGC CAGTCCTCCG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Murine leukemia virus
- (B) SOUCHE: souche Friend
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 7

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CGGGATCCGC TAGCAAACCTT AAGGGG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (B) SOUCHE: gene neomycine
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGGGTCGACA CTAGTGATTG AACAA

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

- 29 -

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: gene neomycine

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 11

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GCTCTAGAGG ATCCGGCAGG TTGGGCG

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de rat

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 12

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGGCTAGCGG CAAGCCGGCC G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de rat

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 13

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGGCTAGCCC CATGGCAACC CCCAAAACAC

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

- 30 -

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: element VL30 de rat
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GGGCTAGCGG CAAGCCGGCC G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: element VL30 de rat
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 9

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GGGCTAGCCC CATGGCCGGA TCTCCCTC

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: Murine sarcoma virus
  - (B) SOUCHE: HaMSV
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 16

- 31 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GCTCGAGCTA GCTGCAGCGC CAGTCCTCCG T

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de souris (oligo 3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGAATTCTG GCCAGATTCT TTGTTCTG

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de souris (oligo 4)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CCGCTAGCCC CATGGCAACT TAAAAACAG

29

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de souris

- 32 -

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:  
CCGAATTCTG GCCAGATTCT TTGTTCTG 28
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
    - (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
    - (B) TYPE: acide nucléique
    - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
    - (D) CONFIGURATION: linéaire
  - (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
  - (iii) HYPOTHETIQUE: NON
  - (iii) ANTI-SENS: OUI
  - (vi) ORIGINE:
    - (B) SOUCHE: element VL30 de souris (oligo 2)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:  
CCGCTAGCCC CATGGCGTCC CTGATCC 27
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
    - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
    - (B) TYPE: acide nucléique
    - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
    - (D) CONFIGURATION: linéaire
  - (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
  - (iii) HYPOTHETIQUE: NON
  - (iii) ANTI-SENS: NON
  - (vi) ORIGINE:
    - (B) SOUCHE: polylinker (oligo 5)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:  
TGGCCAGCTG AAGCTTGCCA TGGG 24

- 33 -

### Revendications

1. Un fragment d'ADN isolé comprenant un site interne d'entrée des ribosomes et/ou une séquence d'encapsulation, caractérisé en ce que ledit fragment est dérivé d'un rétrotransposon.
2. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 100 nucléotides correspondant à l'extrémité 5' dudit rétrotransposon en aval de la répétition directe.
3. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 d'origine murine.
4. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rat.
5. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1, (i) commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 590 ou (ii) commençant au nucléotide 176 et se terminant au nucléotide 590.
6. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de souris.
7. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 788.
8. Un vecteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt comprenant un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1 à 7.
9. Un vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique ou d'un vecteur viral dérivé d'un virus sélectionné parmi le groupe des poxvirus, adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus et rétrovirus.
10. Un vecteur selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN est positionné en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel ledit gène code.
11. Un vecteur rétroviral selon la revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN est positionné :

- 34 -

- (i) en aval du LTR 5' dudit vecteur rétroviral ; et/ou
  - (ii) en amont d'un gène d'intérêt
- pour permettre l'encapsulation dudit vecteur rétroviral et/ou pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel ledit gène code.
- 12. Un vecteur rétroviral selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence d'encapsulation issue d'un rétrovirus.
  - 13. Un vecteur rétroviral selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que le LTR 5' dudit vecteur rétroviral contrôle l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt.
  - 14. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux fragments d'ADN selon l'une des revendications 1 à 7 ; lesdits fragments d'ADN étant dérivés de rétrotransposons d'origines différentes.
  - 15. Un vecteur selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN selon la revendication 4 ou 5 et un fragment d'ADN selon la revendication 6 ou 7.
  - 16. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend un gène d'intérêt codant pour un produit d'expression sélectionné parmi le facteur VIII, le facteur IX, la protéine CFTR, la dystrophine, l'insuline, l'interféron gamma, une interleukine et un marqueur de sélection.
  - 17. Une particule virale générée à partir d'un vecteur viral selon l'une des revendications 8 à 16.
  - 18. Une cellule animale comprenant un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16 ou infectée par une particule virale selon la revendication 17.
  - 19. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16, d'une particule virale selon la revendication 17 ou d'une cellule animale selon la revendication 18 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique.
  - 20. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16, une particule virale selon la revendication 17 ou une cellule animale selon la revendication 18 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
  - 21. Une composition pharmaceutique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence entre  $10^6$  et  $10^{11}$  pfu particules virales selon la revendication 17.



- 35 -

22. Un vecteur polycistronique pour l'expression d'au moins deux gènes d'intérêt comprenant un site interne d'entrée des ribosomes positionné entre deux des dits gènes d'intérêt caractérisé en ce que ledit site interne d'entrée des ribosomes dérive de la séquence d'encapsidation du rétrovirus de la leucémie murine de Moloney.

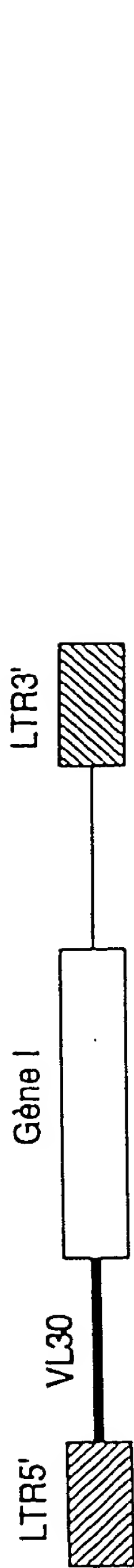


FIGURE 1A

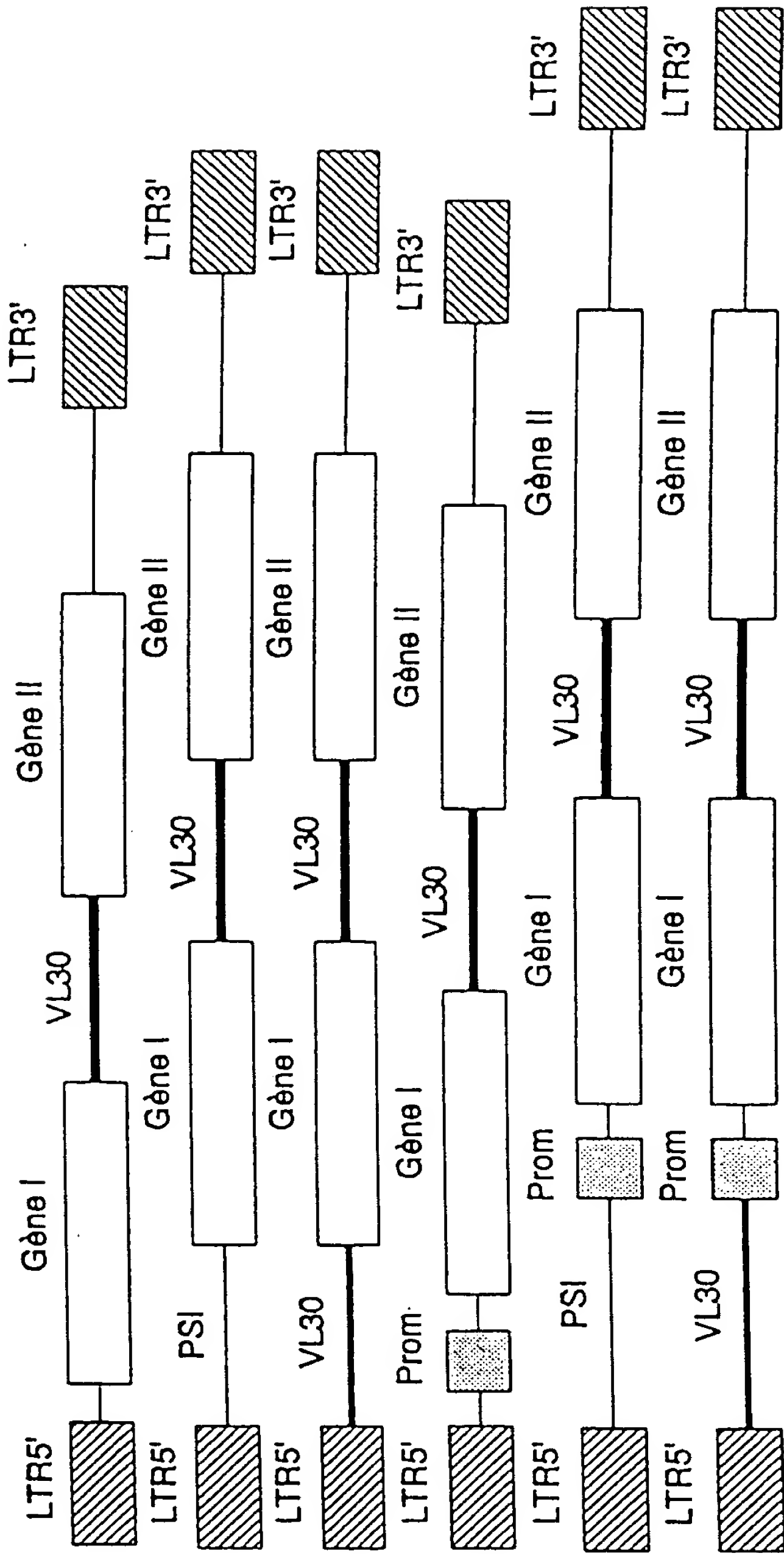
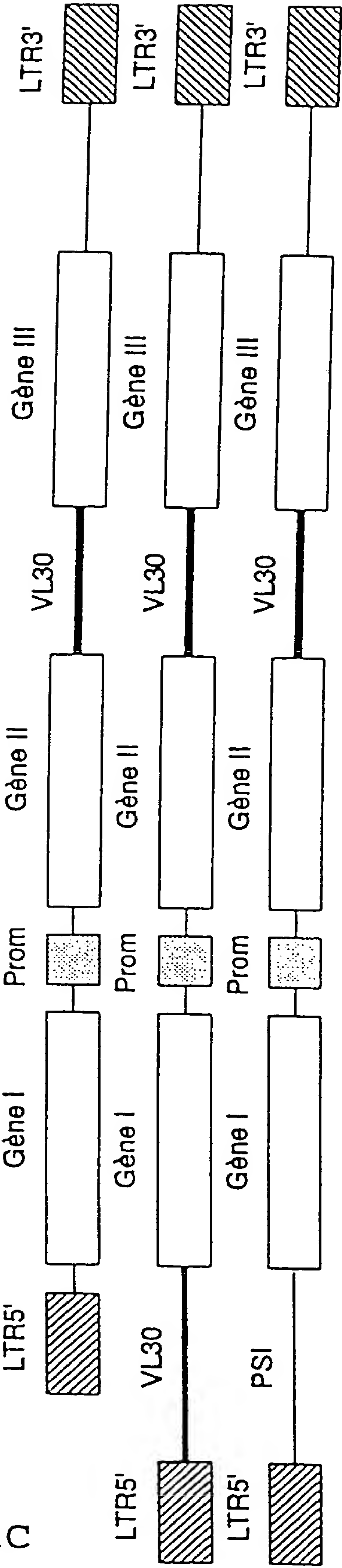


FIGURE 1B

FIGURE 1C



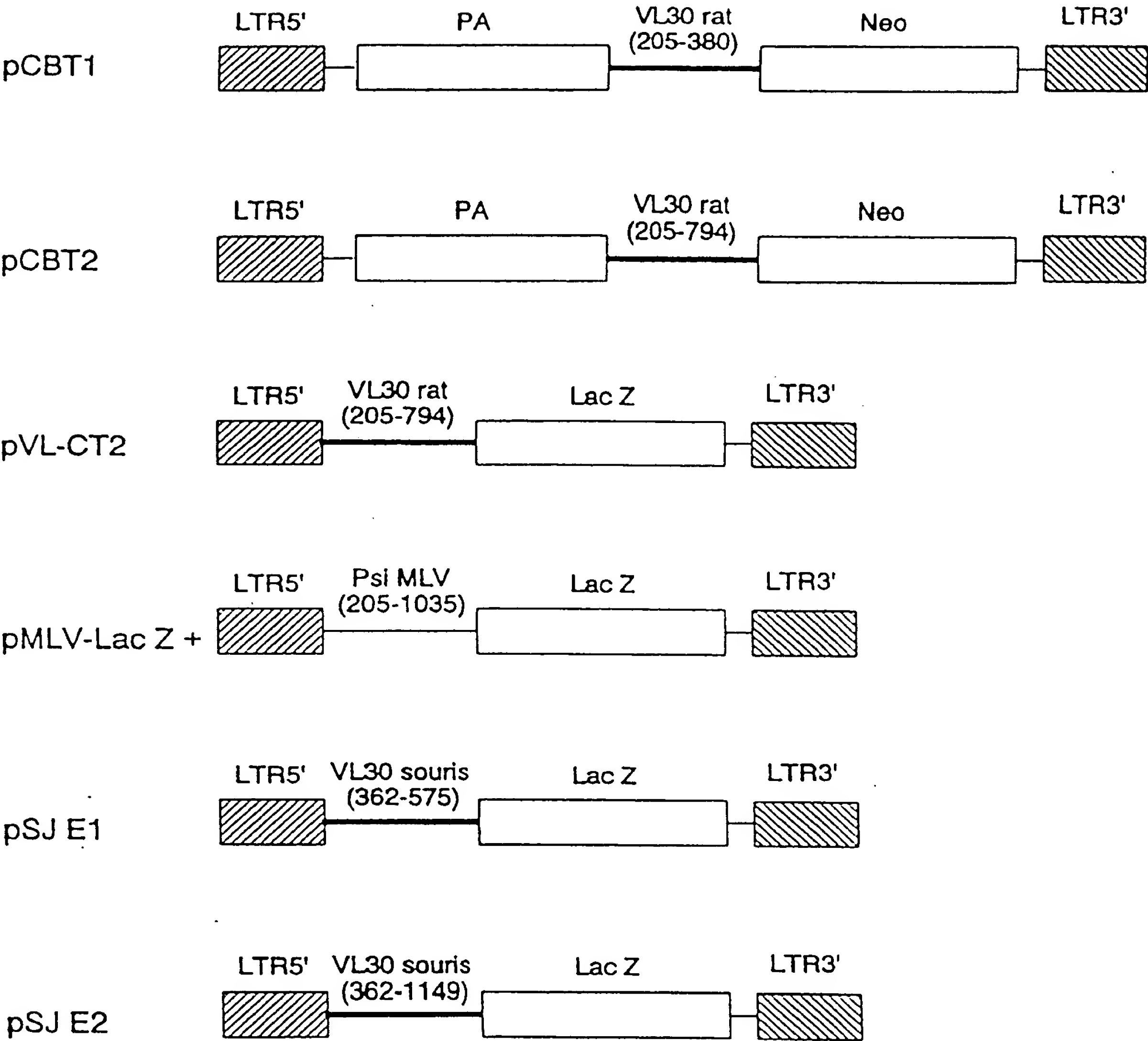


FIGURE 2

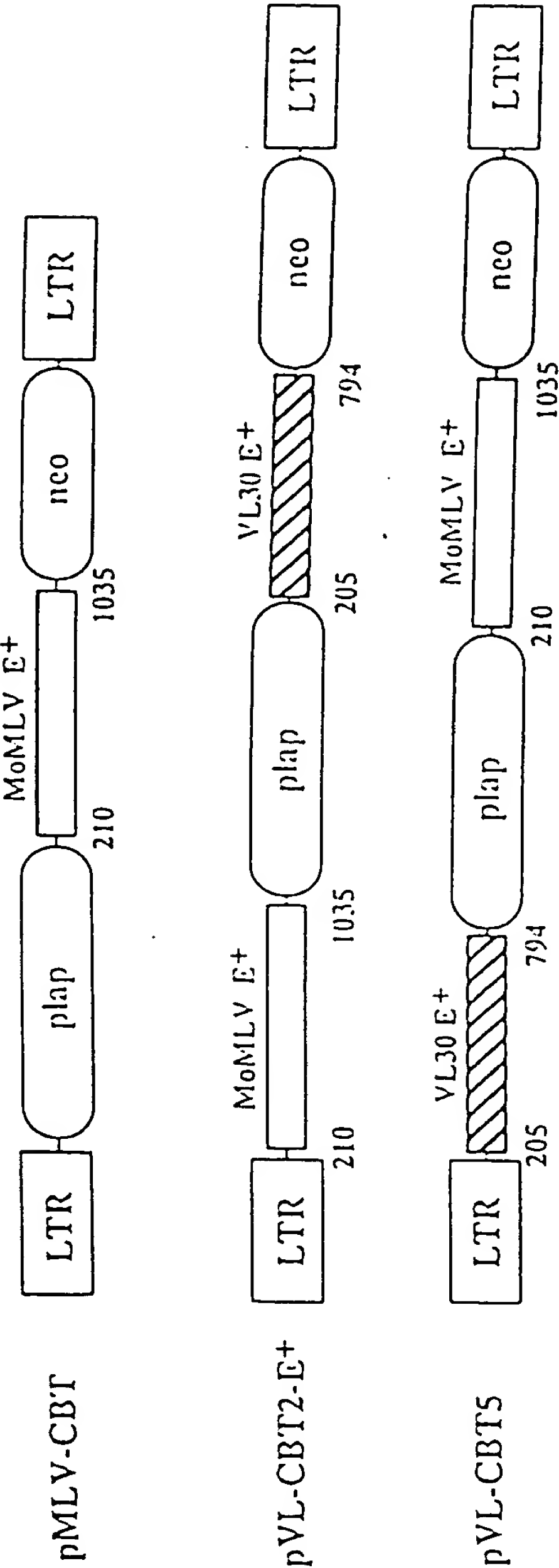


FIGURE 3





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ I

WO 9601324A3

(51) Classification internationale des brevets 6 :

C12N 15/85, 15/86, A61K 48/00, C12N  
15/12 // 15/17, 15/23, 15/24

A3

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/01324

(43) Date de publication internationale:

18 janvier 1996 (18.01.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00894

(22) Date de dépôt international: 5 juillet 1995 (05.07.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/08300

5 juillet 1994 (05.07.94)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT  
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-  
75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

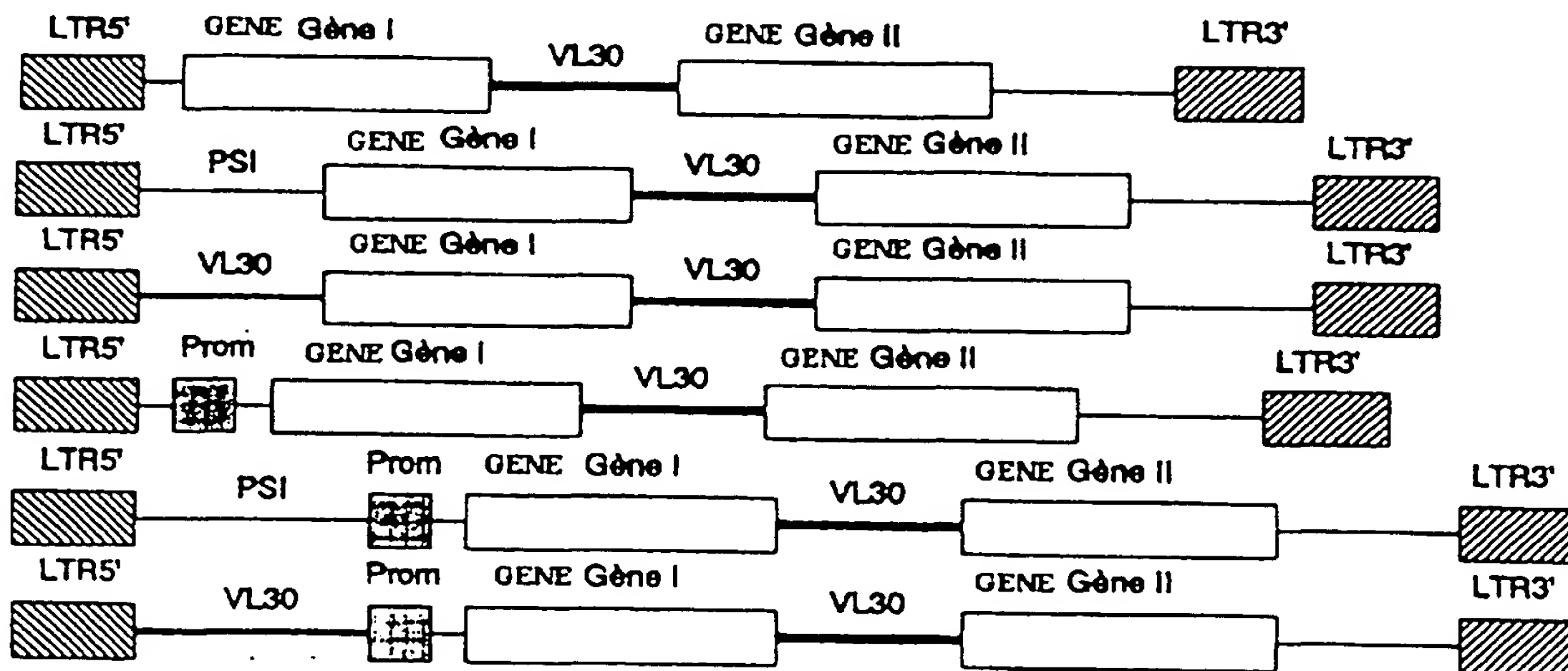
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BERLIOZ, Clarisse  
[FR/FR]; 13, rue Villebois-Marcueil, F-69003 Lyon  
(FR). JACQUEMOUD, Sandrine [FR/FR]; 212, avenue  
Félix-Faure, F-69003 Lyon (FR). TORRENT, Christophe  
[FR/FR]; 13, rue Villebois-Marcueil, F-69003 Lyon (FR).  
DARLIX, Jean-Luc [FR/FR]; Les Genêts II, F-69630  
Chaponost (FR).(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, av-  
enue Kléber, F-75116 Paris (FR).(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE,  
CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification  
des revendications, sera republiée si de telles  
modifications sont reçues.(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 29 février 1996 (29.02.96)

(54) Title: NOVEL INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE, VECTOR CONTAINING SAME AND THERAPEUTICAL USE THEREOF

(54) Titre: NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTREE DES RIBOSOMES, VECTEUR LE CONTENANT ET UTILISATION THERA-  
PEUTIQUE

(57) Abstract

A novel internal ribosome entry site and a novel region for the encapsidation of a retrotransposon, and murine VL30s in particular, are disclosed. A vector and a eukaryotic cell containing said site and region, and their therapeutic or prophylactic use, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet un nouveau site interne d'entrée des ribosomes et une nouvelle région d'encapsidation d'un rétrotransposon et notamment des VL30 murins. Elle concerne également un vecteur et une cellule eucaryote les contenant ainsi que leur usage thérapeutique ou prophylactique.



### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 95/00894

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/85 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 //C12N15/17,  
C12N15/23, C12N15/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 2, pages 661-667, TORRENT, C. ET AL. 'A small and efficient dimerization/packaging signal of rat VL30 RNA and its use in murine leukemia virus-VL30-derived vectors for gene transfer' cited in the application	1-5
Y	see the whole document	8-10, 17-22
Y	--- WO,A,93 03143 (ANDERSON W FRENCH ;MORGAN RICHARD A (US); COUTURE LARRY (US)) 18 February 1993 cited in the application see page 5 - page 9 see claims ---	8-10, 17-22
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 1995

Date of mailing of the international search report

28.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No  
PCT/FR 95/00894

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 3, OXFORD GB, page 673 HODGSON, C. ET AL. 'Nucleotide sequence of mouse virus-like (VL30) retrotransposon BVL-1' see the whole document ---	1-3, 6, 7
T	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 240 (5). 1994. 434-444, TORRENT, C. ET AL. 'Analytical study of rat retrotransposon VL30 RNA dimerization in vitro and packaging in murine leukemia virus.' see the whole document ---	1-22
A	WO, A, 92 07950 (HODGSON CLAGUE PITMAN) 14 May 1992 see page 10, line 25 - page 15 see claims ---	1-21
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 8, no. 8, WASHINGTON US, pages 2989-2998, ADAMS, S. ET AL. 'Complete nucleotide sequence of a mouse VL30 retro-element' cited in the application see figure 1 ---	1-7
O, P, X	KEYSTONE SYMPOSIUM ON GENE THERAPY AND MOLECULAR MEDICINE, STEAMBOAT SPRINGS, COLORADO, USA, MARCH 26-APRIL 1, 1995. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY SUPPLEMENT 0 (21A). 1995. 408, HOMANN, H. ET AL. 'New generation of safe, efficient retroviral vectors and packaging cell lines for application in gene therapy trials.' see abstract C6-422 ---	1-5, 8-11, 18
O, P, X	KEYSTONE SYMPOSIUM ON GENE THERAPY AND MOLECULAR MEDICINE, STEAMBOAT SPRINGS, COLORADO, USA, MARCH 26-APRIL 1, 1995. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY SUPPLEMENT 0 (21A). 1995. 408, HODGSON, C. ET AL. 'Expression of VL30 vectors in primary cell types which are targets for gene therapy' see abstract C6-421 -----	1-3, 6-9, 18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00894

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9303143	18-02-93	CA-A- 2114416	18-02-93
		EP-A- 0598029	25-05-94
		JP-T- 6509713	02-11-94
-----			
WO-A-9207950	14-05-92	EP-A- 0506945	07-10-92
		JP-T- 5503636	17-06-93
		US-A- 5354674	11-10-94
-----			

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le Internationale No  
PCT/FR 95/00894

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/85 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 //C12N15/17,  
C12N15/23, C12N15/24

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 2, pages 661-667, TORRENT, C. ET AL. 'A small and efficient dimerization/packaging signal of rat VL30 RNA and its use in murine leukemia virus-VL30-derived vectors for gene transfer' cité dans la demande	1-5
Y	voir le document en entier	8-10, 17-22
Y	WO, A, 93 03143 (ANDERSON W FRENCH ; MORGAN RICHARD A (US); COUTURE LARRY (US)) 18 Février 1993 cité dans la demande voir page 5 - page 9 voir revendications	8-10, 17-22
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28.12.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

## C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 3, OXFORD GB, page 673 HODGSON, C. ET AL. 'Nucleotide sequence of mouse virus-like (VL30) retrotransposon BVL-1' voir le document en entier ---	1-3,6,7
T	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 240 (5). 1994. 434-444, TORRENT, C. ET AL. 'Analytical study of rat retrotransposon VL30 RNA dimerization in vitro and packaging in murine leukemia virus.' voir le document en entier ---	1-22
A	WO,A,92 07950 (HODGSON CLAGUE PITMAN) 14 Mai 1992 voir page 10, ligne 25 - page 15 voir revendications ---	1-21
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 8, no. 8, WASHINGTON US, pages 2989-2998, ADAMS, S. ET AL. 'Complete nucleotide sequence of a mouse VL30 retro-element' cité dans la demande voir figure 1 ---	1-7
O,P, X	KEYSTONE SYMPOSIUM ON GENE THERAPY AND MOLECULAR MEDICINE, STEAMBOAT SPRINGS, COLORADO, USA, MARCH 26-APRIL 1, 1995. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY SUPPLEMENT 0 (21A). 1995. 408, HOMANN, H. ET AL. 'New generation of safe, efficient retroviral vectors and packaging cell lines for application in gene therapy trials.' see abstract C6-422 ---	1-5, 8-11,18
O,P, X	KEYSTONE SYMPOSIUM ON GENE THERAPY AND MOLECULAR MEDICINE, STEAMBOAT SPRINGS, COLORADO, USA, MARCH 26-APRIL 1, 1995. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY SUPPLEMENT 0 (21A). 1995. 408, HODGSON, C. ET AL. 'Expression of VL30 vectors in primary cell types which are targets for gene therapy' see abstract C6-421 -----	1-3,6-9, 18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

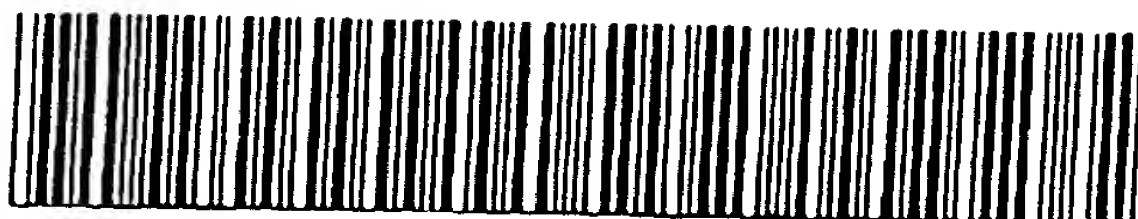
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: le Internationale No

PCT/FR 95/00894

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9303143	18-02-93	CA-A-	2114416	18-02-93
		EP-A-	0598029	25-05-94
		JP-T-	6509713	02-11-94
-----				
WO-A-9207950	14-05-92	EP-A-	0506945	07-10-92
		JP-T-	5503636	17-06-93
		US-A-	5354674	11-10-94
-----				





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE I

WO 9601324A3

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :C12N 15/85, 15/86, A61K 48/00, C12N  
15/12 // 15/17, 15/23, 15/24

A3

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/01324

(43) Date de publication internationale:

18 janvier 1996 (18.01.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00894

(22) Date de dépôt international: 5 juillet 1995 (05.07.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/08300

5 juillet 1994 (05.07.94)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT  
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-  
75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BERLIOZ, Clarisse  
[FR/FR]; 13, rue Villebois-Marcuil, F-69003 Lyon  
(FR). JACQUEMOUD, Sandrine [FR/FR]; 212, avenue  
Félix-Faure, F-69003 Lyon (FR). TORRENT, Christophe  
[FR/FR]; 13, rue Villebois-Marcuil, F-69003 Lyon (FR).  
DARLIX, Jean-Luc [FR/FR]; Les Genêts II, F-69630  
Chaponost (FR).(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, av-  
enue Kléber, F-75116 Paris (FR).(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE,  
CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

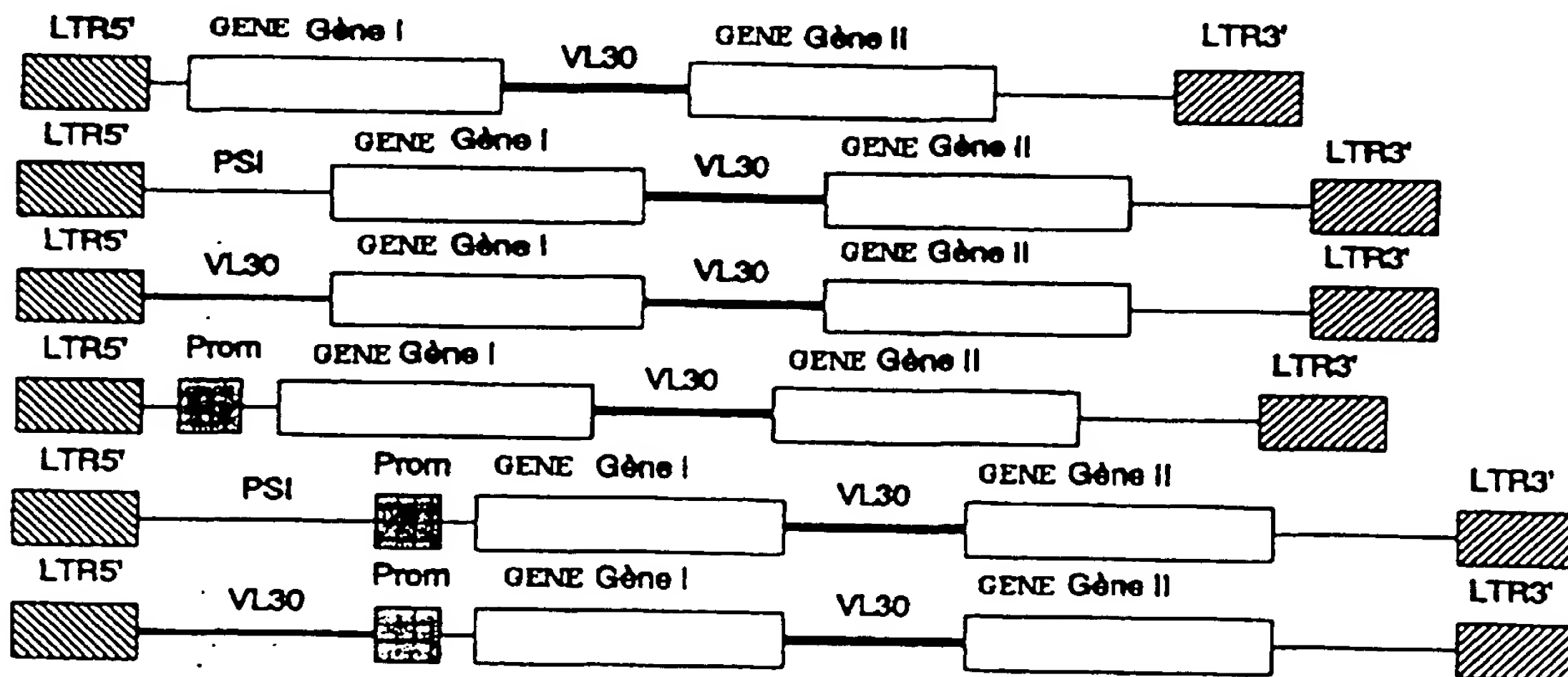
Avec revendications modifiées

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 29 février 1996 (29.02.96)

Date de publication des revendications modifiées:

21 mars 1996 (21.03.96)

(54) Title: NOVEL INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE, VECTOR CONTAINING SAME AND THERAPEUTICAL USE THEREOF

(54) Titre: NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTREE DES RIBOSOMES, VECTEUR LE CONTENANT ET UTILISATION THERA-  
PEUTIQUE

(57) Abstract

A novel internal ribosome entry site and a novel region for the encapsidation of a retrotransposon, and murine VL30s in particular, are disclosed. A vector and a eukaryotic cell containing said site and region, and their therapeutic or prophylactic use, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet un nouveau site interne d'entrée des ribosomes et une nouvelle région d'encapsidation d'un rétrotransposon et notamment des VL30 murins. Elle concerne également un vecteur et une cellule eucaryote les contenant ainsi que leur usage thérapeutique ou prophylactique.

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**REVENDICATIONS MODIFIEES**

[reçues par le Bureau international le 5 février 1996 (05.02.96);  
revendications 1-22 remplacées par les revendications 1-23 modifiées (3 pages)]

1. Un vecteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt comprenant un fragment d'ADN, comprenant :
  - (i) un site interne d'entrée des ribosomes dérivé d'un rétrotransposon, et/ou
  - (ii) une séquence d'encapsidation dérivée d'un rétrotransposon à l'exception d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rat, ou
  - (iii) une séquence d'encapsidation dérivée d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rat d'au moins 174 nucléotides et d'au plus 882 nucléotides.
2. Un vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique ou d'un vecteur viral dérivé d'un virus sélectionné parmi le groupe des poxvirus, adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus et rétrovirus.
3. Un vecteur selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ledit fragment d'ADN comprend un site interne d'entrée des ribosomes dérivé d'un rétrotransposon.
4. Un vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN est positionné en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel ledit gène code.
5. Un vecteur selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel ledit fragment d'ADN comprend une séquence d'encapsidation dérivée d'un rétrotransposon à l'exception d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rat.
6. Un vecteur selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel ledit rétrotransposon comprend au moins 100 nucléotides correspondant à l'extrémité 5' dudit rétrotransposon en aval de la répétition directe.
7. Un vecteur selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel ledit rétrotransposon est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rongeur.
8. Un vecteur selon la revendication 7, dans lequel ledit rétrotransposon est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rat.
9. Un vecteur selon la revendication 7, dans lequel ledit rétrotransposon est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de souris.
10. Un vecteur selon la revendication 9, dans lequel ledit fragment d'ADN est substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 788.

11. Un vecteur selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel ledit fragment d'ADN, comprend une séquence d'encapsidation dérivée d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rat d'au moins 174 nucléotides et d'au plus 882 nucléotides.
12. Un vecteur selon la revendication 8 ou 11, dans lequel ledit fragment d'ADN est substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 590.
13. Un vecteur rétroviral selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN est positionné :
  - (i) en aval du LTR5' dudit vecteur rétroviral ; et/ou
  - (ii) en amont d'un gène d'intérêtpour permettre l'encapsidation dudit vecteur rétroviral et/ou améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel ledit gène code.
14. Un vecteur rétroviral selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence d'encapsidation issue d'un rétrovirus.
15. Un vecteur rétroviral selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que le LTR5' dudit vecteur rétroviral contrôle l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt.
16. Un vecteur pour l'expression de plusieurs gènes d'intérêt selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :
  - (i) un fragment d'ADN comprenant un site interne d'entrée des ribosomes dérivé d'un rétrotransposon, et
  - (ii) un fragment d'ADN comprenant une séquence d'encapsidation dérivée d'un rétrotransposon.lesdits fragments d'ADN étant dérivés de rétrotransposons d'origines différentes.
17. Un vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN tel que défini dans la revendication 9 ou 10 et un fragment d'ADN tel que défini dans la revendication 8, 11 ou 12.
18. Un vecteur selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend un gène d'intérêt codant pour un produit d'expression sélectionné parmi le facteur VII, le facteur VIII, le facteur IX, la protéine CFTR, la dystrophine, l'insuline, l'interféron gamma, une interleukine et un marqueur de sélection.
19. Une particule virale générée à partir d'un vecteur viral selon l'une des revendications 1 à 18.
20. Une cellule animale comprenant un vecteur selon l'une des revendications 1 à 18 ou infectée par une particule virale selon la revendication 19.

21. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 1 à 18, d'une particule virale selon la revendication 19 ou d'une cellule animale selon la revendication 20 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique.
22. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon l'une des revendications 1 à 18, une particule virale selon la revendication 19 ou une cellule animale selon la revendication 20 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
23. Une composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence entre  $10^6$  et  $10^{11}$  pfu particules virales selon la revendication 19.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**